

# 化学合成 microRNA-21 inhibitors 对大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响

张 猛<sup>1,2</sup> 陶 辉<sup>1,2</sup> 陈泽文<sup>1,2</sup> 张家贵<sup>1,2</sup> 宣海洋<sup>1,2</sup> 占红英<sup>1,2</sup> 石开虎<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究 microRNA-21 inhibitors 对大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响。方法 应用 Lipofectamine™ 2000 Reagent 向大鼠心肌成纤维细胞瞬时转染 microRNA-21 inhibitors 24、48 h 后,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 microRNA-21、I 型胶原前胶原 A1(Col1A1)和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达水平;Western blot 法检测 Col1A1 和  $\alpha$ -SMA 的表达水平;MTT 法检测 microRNA-21 inhibitors 对心肌成纤维细胞活化增殖的影响。结果 转染 microRNA-21 inhibitors 的心肌成纤维细胞中,microRNA-21 表达下调,Col1A1 和  $\alpha$ -SMA 的表达下降;转染 microRNA-21 inhibitors 的心肌成纤维细胞增殖活性明显减弱。结论 microRNA-21 inhibitors 可明显抑制心肌成纤维细胞增殖活性,提示 microRNA-21 是心肌成纤维细胞活化增殖的潜在靶向分子,有利于为干预和预防心肌纤维化的发生发展提供新思路。

**关键词** microRNA-21; 心肌成纤维细胞; Col1A1;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0577-05

心肌纤维化是指心肌细胞外基质中胶原纤维过量积聚、胶原含量显著升高或胶原成分发生改变的病理过程,是心肌重构的一个重要特征<sup>[1-2]</sup>。心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是心肌间质的主要构成细胞,其增殖、活化及表型转换为肌成纤维细胞并合成分泌大量胶原纤维蛋白。CFs 的活化增殖是心肌纤维化的关键环节。microRNA 是一类内源性、非编码、单链 RNA,参与心血管系统的生理及多种病理过程。microRNA-21 在心脏中表达丰富,而且其生理功能与心肌纤维化密切相关。microRNA-21 在心肌纤维化的发生发展中起重要的调节作用<sup>[3]</sup>。尽管国内外学者对心肌纤维化和 microRNA-

21 进行了大量研究,但 CFs 中 microRNA-21 的确切作用机制尚不完全清楚。该实验以体外培养的 CFs 为研究对象,通过观察 microRNA-21 inhibitors 转染后 CFs 的增殖影响、I 型胶原前胶原 A1(collagen type I alpha 1, Col1A1)及 CFs 表型转换为肌成纤维细胞的标志性蛋白  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达变化,为心肌纤维化、心脏重构提供新的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 雄性 SD 乳鼠 30 只,出生 1~3 d,  $\delta$  ~ 9 g,清洁级,购于安徽医科大学实验动物中心。

**1.1.2 主要试剂** DMEM 培养基、胰蛋白酶、MTT 相关试剂(Sigma 公司,美国);胎牛血清(Gibco 公司,英国);Lipofectamine™ 2000 Reagent、TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国);microRNA-21 inhibitors、EzOmics miRNA qPCR Detection Primer 试剂盒、EzOmics One-Step qPCR 试剂盒(Biomic 公司,美国);ThermoScript RT-PCR 试剂盒(Fermentas 公司,美国);Western blot 法相关一抗(Bioworld Technology 公司,美国)、相关二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国);转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )(Peprotech 美国)。

**1.1.3 主要仪器** NAPCO-6100 型细胞培养箱(SHELLAB 公司,美国);SW-CJ-IF 型超净工作台(苏州泰安空气技术有限公司,中国);Sigma3-46K 高速离心机(Sigma 公司,美国);7800 型 PCR 反应扩增仪(ABI 公司,美国);Western blot 法相关设备(Biorad 公司,美国);MK3 酶标仪(雷勃公司,荷兰)。

### 1.2 方法

**1.2.1 CFs 的提取与培养** 将 SD 乳鼠浸泡于 75° 酒精消毒并处死,在无菌操作台上剪取心尖组织,剪碎并用 1.25% 胰蛋白酶消化分离细胞,所得全部细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 60~90 min,差速贴壁法除去心肌细胞,剩下的细胞即为 CFs。继续培养

2015-02-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH117、1408085MH175);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A175、KJ2012Z164)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230601

作者简介:张 猛,男,硕士研究生;

石开虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shikaihu@gmail.com

细胞至汇合状态,采用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取 2~4 代细胞用于实验,在倒置显微镜下观察到可被免疫组化纤维黏连蛋白染色变为阳性者即鉴定为 CFs。

**1.2.2 实验分组** 实验组:瞬时转染 microRNA-21 inhibitors 后的 CFs; 阴性对照组:瞬时转染 microRNA-21 inhibitors 阴性对照后的 CFs; 空白对照组:以等量的生理盐水代替 microRNA-21 inhibitors,瞬时转染 CFs。

**1.2.3 瞬时转染 microRNA-21 inhibitors** 取对数生长期 CFs 进行转染。转染前 1 d 将各组 CFs 细胞计数后,接种于 24 孔板,用无血清不含抗生素的 DMEM 培养液稀释待转染。成熟引物 microRNA-21 inhibitors 及其阴性对照由 Biomic 生物技术公司设计并合成。miRNA-21 inhibitor 的引物序列:5'-UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA-3'。将 miRNA-21 inhibitors 及其阴性对照与脂质体 Lipofectamine™ 2000 Reagent 混匀,室温静置 20 min 后,加入相应各孔细胞中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 保温箱孵育 4~6 h,更换含血清 DMEM 并用浓度为 10 ng/ml 的生长刺激因子 TGF-β 刺激细胞生长,24、48 h 提取转染后细胞的总 RNA。

**1.2.4 总 RNA 提取和一步法 qRT-PCR 检测 microRNA-21** 检测转染后各组 CFs 中的 microRNA-21 含量,用 ABI RT-PCR 系统进行 qRT-PCR 检测。采用 TRIzol 并根据操作手册一步法抽提细胞总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度,通过计算吸光度 (absorbance, A) A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值了解其纯度,选取比值在 1.8~2.0 的 RNA 样品进行试验。采用 EzOmics miRNA qPCR Detection Primer 试剂盒与 EzOmics One-Step qPCR 试剂盒并参照操作手册检测 microRNA-21。反应条件:42 °C 30 min、95 °C 10 min,接着 95 °C 20 s、62 °C 30 s、72 °C 30 s 共 40 个循环的扩增阶段条件;95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s 的溶解曲线阶段条件。以 U6 作为内参,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的相对表达水平。

**1.2.5 定量 RT-PCR 检测 Col1A1 和 α-SMA mRNA 表达** 各组总 RNA 用 ThermoScript RT-PCR 试剂盒并参照操作手册逆转录合成 cDNA,然后进行 qRT-PCR 检测。从 GenBank 中查找引物序列并设计合成相应引物。α-SMA 引物序列: F: 5'-TGGCCACT-GCTGCTTCCTCTTCTT-3', R: 5'-GGGGCCAGCT-TCGTCATACTCCT-3'; Col1A1 引物序列: F: 5'-TA-ACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG-3', R: 5'-

GTCCAGCCCTCATCCTGGCC-3'; β-actin 引物序列: F: 5'-ACGGTCAGGTCATCACTATC-3', R: 5'-ACTGT-GTTGGCATAGAGGTC-3'。反应条件: 50 °C 2 min、95 °C 10 min,接着 95 °C 20 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s 共 40 个循环的扩增阶段条件;95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s 的溶解曲线阶段条件。以 β-actin 作为内参,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的相对表达水平。

**1.2.6 Western blot 法检测 Col1A1 和 α-SMA 蛋白表达** 将提取的各组细胞蛋白定量,然后通过 SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜上,转膜后封闭 2 h,加入 Col1A1、α-SMA 和 β-actin 一抗孵育过夜,然后加入 Col1A1、α-SMA 和 β-actin 二抗孵育 1 h,化学发光法显示蛋白条带,胶片显影、定影。成像结果采用 Quantity One V 4.6 软件分析,测定主带的吸光度值以计算 Col1A1、α-SMA 蛋白表达水平。

**1.2.7 MTT 比色法检测细胞增殖** 将处于对数生长期的各组 CFs 胰蛋白酶消化后,用完全培养基重悬形成细胞悬液。用血球计数板进行细胞计数。调整细胞密度为 1 500 个/孔,铺于 96 孔板中,每组 5 个复孔,每孔 100 μl,共 5 张 96 孔板,连续监测 5 d,铺板过程中要确保每孔加入细胞数一致。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。从铺板后第 2 天开始,培养终止前 4 h 每孔加入 10 μl 5 g/L 的 MTT,无需换液,4 h 后,吸弃培养液,每孔加入 100 μl DMSO 终止反应,振荡器震荡 5~10 min 使结晶充分溶解,酶标仪 490 nm 处测定 A 值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,单变量两组资料间的比较采用 *t* 检验。所有实验数据分析至少重复 3 次。

## 2 结果

**2.1 瞬时转染 microRNA-21 inhibitors 对 microRNA-21 表达的影响** 瞬时转染 CFs microRNA-21 inhibitors 48 h 后,实验组 microRNA-21 表达明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义 ( $t = 14.384, P < 0.01; t = 15.290, P < 0.01$ )。见图 1。

**2.2 瞬时转染 microRNA-21 inhibitors 对 Col1A1 和 α-SMA mRNA 表达的影响** 瞬时转染 CFs microRNA-21 inhibitors 48 h 后,实验组 Col1A1 和 α-SMA mRNA 表达明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义 (Col1A1: 实验组 vs 空白对照组:  $t = 13.694, P < 0.01$ ; 实验组 vs 阴性对照组:  $t = 14.571, P < 0.01$ ; α-SMA: 实验组 vs 空白对照组:  $t = 5.869, P < 0.01$ ; 实验组 vs 阴性对照组:  $t = 7.286, P$

<0.01)。见图2。

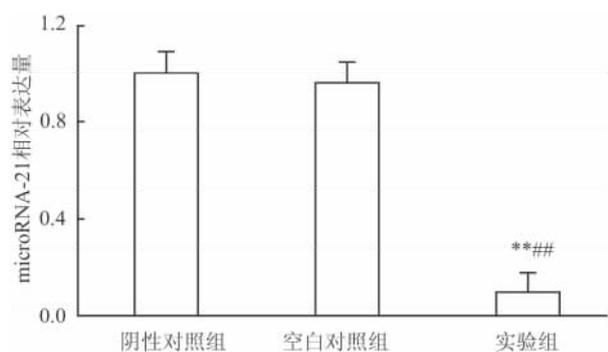


图1 qRT-PCR 检测瞬时转染 CFs microRNA-21 inhibitors

后 microRNA-21 表达变化

与空白对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与阴性对照组比较: ## $P < 0.01$

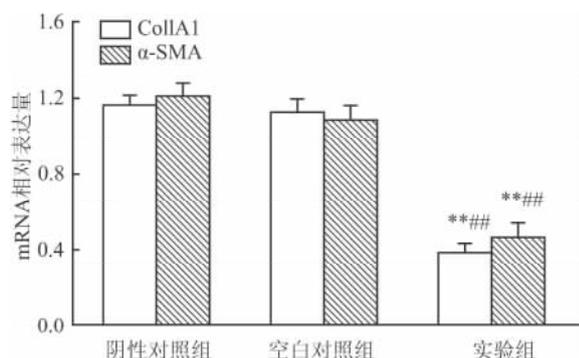


图2 qRT-PCR 检测瞬时转染 CFs microRNA-21 inhibitors 后 CollA1 和  $\alpha$ -SMA mRNA 表达变化

与空白对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与阴性对照组比较: ## $P < 0.01$

**2.3 瞬时转染 microRNA-21 inhibitors 对 CollA1 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达的影响** 瞬时转染 CFs microRNA-21 inhibitors 48 h 后, 实验组 CollA1 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达明显低于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 (CollA1: 实验组 vs 空白对照组:  $t = 6.274$ ,  $P < 0.01$ ; 实验组 vs 阴性对照组:  $t = 7.893$ ,  $P < 0.01$ ;  $\alpha$ -SMA: 实验组 vs 空白对照组:  $t = 5.869$ ,  $P < 0.01$ ; 实验组 vs 阴性对照组:  $t = 14.131$ ,  $P < 0.01$ )。见图3。

**2.4 MTT 法检测转染后 CFs 的细胞活力** MTT 法实验结果显示, 瞬时转染 CFs microRNA-21 inhibitors 24、48 h 后, 实验组细胞活力明显低于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 (CollA1: 实验组 vs 空白对照组:  $t = 3.764$ ,  $P < 0.01$ ; 实验组 vs 阴性对照组:  $t = 5.645$ ,  $P < 0.01$ ;  $\alpha$ -SMA: 实验组 vs 空白对照组:  $t = 3.811$ ,  $P < 0.01$ ; 实验组 vs 阴性对照组:  $t = 4.503$ ,  $P < 0.01$ )。见图4。

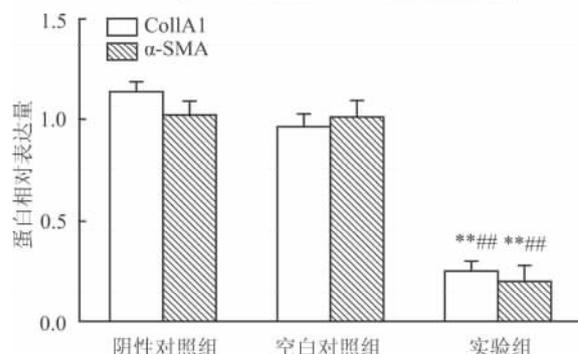
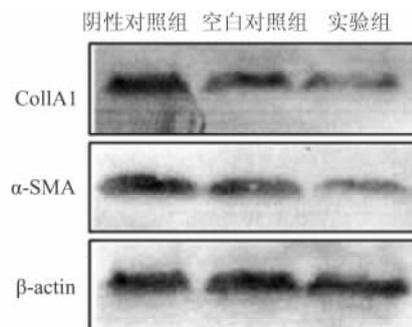


图3 Western blot 法检测瞬时转染 CFs microRNA-21

inhibitors 后 CollA1 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达变化

与空白对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与阴性对照组比较: ## $P < 0.01$

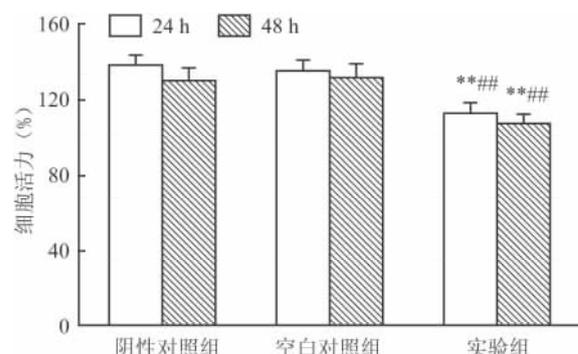


图4 MTT 法检测瞬时转染 CFs microRNA-21

inhibitors 24、48 h 后细胞活力变化

与空白对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与阴性对照组比较: ## $P < 0.01$

### 3 讨论

CFs 是心脏组织中数目最多的细胞, 遍布于心肌组织, 包绕心肌细胞并连接细胞间质, 是心肌纤维化的主要效应细胞, 其过度活化增殖, 可分泌大量的胶原纤维, 在心肌纤维化的发生发展过程中发挥关键性作用<sup>[4-5]</sup>。CFs 是合成和分泌心肌细胞外基质的主要细胞, 受刺激后活化, 发生表型和功能的改变, 转换为表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞, 且过度增殖并积聚大量的细胞外基质, 如 CollA1 等<sup>[6-7]</sup>。因此, 心肌纤维化主要通过 CFs 活化增殖并促进

Col1A1 和  $\alpha$ -SMA 等的过度表达,使细胞外间质胶原纤维沉积、胶原含量显著上升,导致纤维化形成。

文献<sup>[8-9]</sup>报道, microRNA 在心脏结构重构进程中,尤其是在心肌纤维化的发病过程中发挥重要作用。有许多 microRNA 可能发挥调控心肌纤维化的作用,已经证实的有 microRNA-21、microRNA-29、microRNA-133、microRNA-30 和 microRNA-590 等<sup>[10]</sup>。microRNA-21 在心肌纤维化中有关键作用,与心肌纤维化联系密切。Thum et al<sup>[11-12]</sup>发现, microRNA-21 在心肌纤维化中表达升高,上调 microRNA-21 可以刺激 EPK-MAP 信号传导通路,诱导成纤维细胞的增殖和心肌纤维化。Roy et al<sup>[13]</sup>证明,在大鼠心肌缺血再灌注模型中, microRNA-21 在心肌纤维化和结构重构中起关键作用。microRNA-21 之所以能够引起心肌纤维化是因为它与 CFs 有相关关系。研究<sup>[3]</sup>表明 microRNA-21 可以抑制 CFs 的凋亡,引起心肌肥大和心肌纤维化的发生。microRNA-21 inhibitors 是 microRNA-21 的抑制剂,其在 CFs 活化增殖过程中的具体作用机制尚不完全清楚。本研究用 microRNA-21 inhibitors 转染体外培养的新生乳鼠 CFs,检测转染后 CFs 的增殖变化以及 Col1A1 和  $\alpha$ -SMA 的表达水平。结果表明 microRNA-21 inhibitors 可明显抑制 CFs 的增殖活性,降低 Col1A1 和  $\alpha$ -SMA 的表达水平。

综上所述, microRNA-21 inhibitors 转染 CFs 后, microRNA-21 表达下降,而 CFs 中 microRNA-21 的低表达可以抑制其活化增殖,抑制心肌纤维化的发生发展,表明 microRNA-21 是 CFs 活化增殖的潜在靶向分子,可以为干预和预防心肌纤维化提供新思路。

### 参考文献

[1] Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF $\beta$ -

ta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation [J]. *Circ Res* 2010, 106( 11): 1675 - 80.

[2] 汪裕琪, 石开虎, 吴君旭, 等. DNMT3 A 和 Hyp 在 ISO 诱导大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49( 5): 606 - 9.

[3] Dong S, Ma W, Hao B, et al. MicroRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2 [J]. *Clin Exp Pathol*, 2014, 7( 2): 565 - 74.

[4] Takeda N, Manabe I, Uchino Y, et al. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload [J]. *Clin Invest* 2010, 120( 1): 254 - 65.

[5] 郝嘉, 游凯. 心肌成纤维细胞的特性和调节 [J]. *心血管病学进展* 2011, 32( 3): 405 - 8.

[6] Mir S A, Chatterjee A, Mitra A, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 ( STAT3) attenuates interleukin-6 ( IL-6) -induced collagen synthesis and resultant hypertrophy in rat heart [J]. *Biol Chem* 2012, 287( 4): 2666 - 77.

[7] Wu W, Muchir A, Shan J, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibitors improve heart function and prevent fibrosis in cardiomyopathy caused by mutation in lamin A/C gene [J]. *Circulation*, 2011, 123( 1): 53 - 61.

[8] 袁书国, 何凤屏, 徐新. MicroRNA 与心房颤动心肌纤维化关系进展 [J]. *中国医药导报* 2013, 10( 12): 30 - 2.

[9] Wang Z, Lu Y, Yang B. MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals [J]. *Cardiovasc Res* 2011, 89( 4): 710 - 21.

[10] Bauersachs J. Regulation of myocardial fibrosis by microRNAs [J]. *Cardiovasc Pharmacol* 2010, 56( 5): 454 - 9.

[11] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts [J]. *Nature* 2008, 456( 7224): 980 - 4.

[12] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure [J]. *Circulation* 2007, 116( 3): 258 - 67.

[13] Roy S, Khanna S, Hussain S R, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue [J]. *Cardiovasc Res* 2009, 82( 1): 21 - 9.

## The effect of microRNA-21 inhibitors on proliferation and activation of cardiac fibroblasts in rats

Zhang Meng<sup>1, 2</sup>, Tao Hui<sup>1, 2</sup>, Chen Zewen<sup>1, 2</sup>, et al

(<sup>1</sup> Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; <sup>2</sup> Dept of Cardiovascular Disease Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the effect of microRNA-21 inhibitors on proliferation and activation of cardiac fibroblasts in rats. **Methods** Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent was used to transfected cardiac fibroblasts with microRNA-21 inhibitors. After 24 48 h, qRT-PCR was applied to assess the expressions of microRNA-21 and mRNA

# TGF- $\beta$ 1 和 EGFP 体外电转染兔骨髓间充质干细胞的实验研究

文剑明<sup>1</sup>, 王锐英<sup>1</sup>, 高燕<sup>2</sup>, 胡译文<sup>1</sup>, 陶波<sup>1</sup>, 周文静<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过电转染介导转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 转染兔骨髓间充质干细胞 (BMSCs), 观察 II 型胶原表达的情况。方法 用全骨髓细胞贴壁培养法分离、培养兔 BMSCs; 诱导 14 d 后, 免疫组化和 Western blot 法检测 II 型胶原表达。结果 BMSCs CD90 表达阳性, CD31 表达阴性; 成功转染 TGF- $\beta$ 1 至 BMSCs; 通过免疫组化及 Western blot 法检测 TGF- $\beta$ 1 组细胞内 II 型胶原有较强的表达, 与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 组和空白对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 电转 TGF- $\beta$ 1 质粒至兔 BMSCs, 可以促进 II 型胶原表达。

**关键词** TGF- $\beta$ 1; 骨髓间充质干细胞; 电转染; II 型胶原

**中图分类号** R 682.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)05-0581-04

椎间盘退行性变在现实生活中是一种常见而棘手的疾病, 给患者带来巨大的痛苦, 同时也让家庭承受沉重的经济负担, 但是目前尚无有效的方法可以根治这一病症。椎间盘退行性变的始动因素就是髓核细胞发生退变, 由于髓核细胞数量有限, 发生退变后自身修复和增殖困难。目前干细胞治疗退变椎间盘已经成为研究的热点<sup>[1-2]</sup>。该实验在电转染介导下, 将转化生长因子  $\beta$ 1/增强型绿色荧光蛋白 (trans-

forming growth factor beta1/enhanced green fluorescent protein, TGF- $\beta$ 1/EGFP) 导入骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 中, 由于细胞内的 TGF- $\beta$ 1 基因能高效表达, 并能持续分泌 TGF- $\beta$ 1 目的蛋白, 诱导 BMSCs 向类髓核细胞方向分化, 从而为修复退变的椎间盘提供种子细胞。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂仪器** 健康雄性新西兰大白兔 1 只, 2 周龄, 清洁级, 约 250 g, 由桂林医学院实验动物中心提供。胎牛血清、DMEM 低糖培养基和胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司); 混合质粒 TGF- $\beta$ 1/EGFP (美国 Sigma 公司); 兔抗人 II 型胶原蛋白单克隆抗体 (武汉博士德公司); 流式一抗小鼠抗兔 CD90 (美国 Abcam 公司); CD31 (美国 Antigenix 公司); 同型对照小鼠抗兔 IgG1 K (美国 eBioscienc 公司); 流式二抗 PerCP 标记 (美国 jackson 公司); 二抗免疫组织化学染色试剂盒、二抗 FITC 标记 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); FACSAria<sup>TM</sup> III 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 倒置相差显微镜、正置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); CO<sub>2</sub> 孵箱 (美国 Thermo 公司)。

**1.2 BMSCs 的取出、培养及鉴定** 麻醉后处死兔子, 取兔两边的股骨、胫骨和肱骨, 从两边干骺端剪断, 剔除肌肉, 移至培养皿中, 吸取培养液冲洗股骨骨髓腔, 取冲洗液置于培养箱中培养。利用 BMSCs 贴壁的特性, 48 h 后首次换液, 以后每 2 d 换液 1

2015-02-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31260233)

作者单位: <sup>1</sup> 桂林医学院附属医院骨二科, 桂林 541000

<sup>2</sup> 桂林医学院护理学院外科护理教研室, 桂林 541000

作者简介: 文剑明, 男, 硕士研究生;

王锐英, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: rywang@glmc.edu.cn

of Col1A1 and  $\alpha$ -SMA. The protein expression levels of Col1A1 and  $\alpha$ -SMA were detected by Western blot. MTT assay was used to determine the proliferation influence of the transfected cardiac fibroblasts. **Results** The cardiac fibroblasts transfected microRNA-21 inhibitors exhibited down-regulated microRNA-21 expression and attenuated Col1A1 and  $\alpha$ -SMA mRNA expression. The cardiac fibroblasts proliferation activity decreased significantly after transfected microRNA-21 inhibitors. **Conclusion** MicroRNA-21 inhibitors can suppress the proliferation activity of cardiac fibroblasts significantly, implicating microRNA-21 as a potential target for cardiac fibroblasts activation and proliferation and pointing out that this result can provide a new idea for intervening and preventing the myocardial fibrosis occurrence and development.

**Key words** microRNA-21; cardiac fibroblasts; Col1A1;  $\alpha$ -SMA; Western blot